«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«13» _____ 2022 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М

к возбудителям иерсиниозов

(Иерсиния – IgM – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор **«Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ»** предназначен для выявления иммуноглобулинов класса М к патогенным иерсиниям *(Yersinia enterocolitica и Yersinia pseudotuberculosis)* в сыворотке *(плазме)* крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Набор реагентов **«Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ»** представляет собой набор реагентов, основой которого является смесь рекомбинантных антигенов иерсиний, сорбированных на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотке/плазме крови человека иммуноглобулины класса М к *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* за счёт их взаимодействия с иммобилизованными **антигенами (АГ)**. АГ представляют собой рекомбинантные белки внешней мембраны иерсиний (YOPs). Данные АГ высокоспецифичны для *Yersinia*, не обнаружены ни у каких других бактерий и характерны только для штаммов *Yersinia*, патогенных для человека. Образование комплекса антиген-антитело выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих комплексы «антиген-антитело». Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя **оптическую плотность (ОП)** в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. После измерения ОП в лунках на основании рассчитанного значения $ОП_{крит.}$ результат для каждого анализируемого образца оценивается как положительный или отрицательный.

2.2. Состав набора:

- планшет разборный с иммобилизованными антигенами иерсиний – 1 шт.;
- положительный контрольный образец ($К^+$), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- отрицательный контрольный образец ($К^-$), инактивированный – 1 фл., 0,5 мл;
- конъюгат *(антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена)* – 1 фл. или 2 фл.;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения (РПР) – 1 фл., 3 мл;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнками для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия *(рег. № 05-2-439)*, аттестованной ОБТК **АО «Вектор-Бест»,** включающей образцы, содержащие иммуноглобулины класса М к возбудителям иерсиниозов: **чувствительность** по IgM к возбудителю иерсиний – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов должен соответствовать требованиям стандартной панели предприятия *(рег. № 05-2-439)*, аттестованной ОБТК **АО «Вектор-Бест»,** включающей образцы, не содержащие иммуноглобулины класса М к возбудителям иерсиниозов: **специфичность** по IgM к возбудителю иерсиний – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б *(ГОСТ Р 51609-2000)*.

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями с СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00 от 29.10.98.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- термошейкер, поддерживающий температуру (37±1) °С, интенсивность перемешивания 400–800 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования *(погрешность не более 5%);*
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования *(погрешность не более 5%)*;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2–8)°С не более 5 суток, либо при температуре минус (20±4) °С, если необходимо более длительное хранение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10–15 минут.

Нельзя использовать проросшие, гемоли-зированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. ВНИМАНИЕ! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

- Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.
- Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.
- Лиофилизированные компоненты должны быть восстановлены, как минимум, за 15 минут до их использования.
- После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2–8) °С.
- Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.
- Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.
- При промывке лунки *(стрипа, планшета)* заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.
- При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно ёмкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.
- Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.
- При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов *(ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор ТМБ),* которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».
- Наконечники для пипеток *(автоматических дозаторов)* следует использовать однократно.
- Запрещается повторное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.
- Посуду *(ванночки)*, используемые для работы с растворами конъюгата и ТМБ, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.
- В случае повторного использования посуду *(ванночки)* для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду *(ванночки)* для раствора ТМБ сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.
- Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и кон-трольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов (*МУ-231-113-00 от 29.10.98).*
- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.2. Приготовление реагентов.

7.2.1. Промывочный раствор.

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Раствор конъюгата в рабочем разведении												
Конъюгат (концентрат), мкл	α*	2× α	3× α	4× α	5× α	6× α	7× α	8× α	9× α	10× α	11× α	12× α
РК, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
	Раствор ТМБ											
Раствор ТМБ, мл	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = **▲▲▲ мкл** *(значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).*

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 *(см. таблицу)* и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до **700 мл**.

Хранение: при температуре (2–8) °С до 5 суток.

7.2.2. Растворы конъюгата.

Внимание! *Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать* ***одноразовые*** *на-конечники для пипеток.*

7.2.2.1. Приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения со-держимого флакона с конъюгатом в **1,0 мл РПР**.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 3 месяцев при (2–8) °С или до 12 месяцев при минус (20±4) °С. Допускается 3-кратное замораживание концентрированного раствора конъюгата.

Внимание! *Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!*

7.2.2.2. Тщательно взболтать содержимое флакона РК. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество *(см. таблицу)* концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием.

Хранение: конъюгат в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.2.3. Раствор ТМБ.

Внимание! *Раствор ТМБ готов к использованию. Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.*

Рекомендуем выделить наконечники для пипеток, которые использовать ***только*** *для работы с раствором ТМБ.*

Непосредственно перед использованием отобрать в пластиковую ванночку только необходимое в соответствии с числом используемых стрипов количество раствора ТМБ *(см. таблицу)*. Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать *(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ)*.

Хранение: при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при температуре (2–8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор *(п. 7.2.1)*, концентрированный раствор конъюгата *(п. 7.2.2.1)*.

7.3.2. Во все лунки стрипов внести по **90 мкл РРС**. В одну лунку внести **10 мкл $К^+$**, в 2 другие лунки – по **10 мкл $К^-$**. Во все остальные лунки стрипов внести по **10 мкл исследуемых образцов**. При этом цвет раствора в лунках изменится на синий.

Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием (пипе-тирование не менее 4 раз).

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при (37±1) °С в термошейкере при 500 об/мин **30 минут.**

За 5 минут до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении *(п. 7.2.2.2)*.

7.3.3. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! *Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью* ***(400 мкл рабочего промывочного раствора)****. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 секунд.*

По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевёрнутыми стрипами по сложенной в несколько слоёв фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

7.3.4. Внести во все лунки по **100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении**.

Внимание*! Для внесения раствора конъюгата в рабочем разведении использовать пластиковую ванночку и* ***одноразовые*** *наконечники, входящие в состав набора.*

Лунки заклеить плёнкой и инкубировать при температуре (37±1) °С **30 минут**.

7.3.5. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть 5 раз промывочным раствором, удалить влагу как описано выше.

7.3.6. Внести в каждую лунку по **100 мкл раствора ТМБ** *(п. 7.2.3)*.

Внимание! *Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одно-разовые наконечники, прилагаемые к набору.*

Стрипы поместить в защищённое от света место при температуре (18–25) °С на **25 минут**.

7.3.7. Остановить реакцию добавлением в лунки по **100 мкл стоп-реагента** и через 2–3 минуты измерить ОП.

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя ОП в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень *(«бланк»)* осуществлять по воздуху.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не более 0,2 ($ОП_{ср}К^- \leq 0,2$).

значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 0,6 ($ОПК^+ \geq 0,6$);

Вычислить критическое значение ОП **($ОП_{крит}$)** по формуле:

$$\mathbf{ОП_{крит} = ОП_{ср}(К^-) + 0,3},$$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

где $ОП_{ср}(К^-)$ – среднее арифметическое значение ОП в лунках с отрицательным контрольным образцом.

Если $ОП_{ср}(К^-)$ имеет отрицательное значение, считать её равной нулю.

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать **коэффициент позитивности (КП)**:

$$КП = ОП_{иссл.\ сыв.} / ОП_{крит.}$$

При КП < 1,0 результат расценивать как **отрицательный**.

КП ≥ 1,0 – результат **положительный.**

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8) °С. Замораживание не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора;
- контрольные образцы, ФСБ-Т×25, РРС, РК, РПР, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности набора;
- концентрированный раствор конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2–8) °С в течение 3 месяцев с момента приготовления или при температуре минус (20±4) °С в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор можно хранить при температуре (2–8) °С до 5 суток с момента притовления.

*По вопросам, касающимся качества набора **«Иерсиния-IgM-ИФА-БЕСТ»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-68-23.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Набор **«Иерсиния – IgM – ИФА – БЕСТ»** рекомендуется для:
диагностики иерсиниозов;
наблюдения в процессе лечения и последующей диспансеризации;
обследование контактных лиц.

Согласно литературным данным **антитела (АТ)** класса G к *Yersinia* встречаются у 10–40% населения, АТ класса А – до 11%, АТ класса М – до 2%. Эти цифры отражают распространенность иерсиниозов среди взрослого населения.

Для правильной интерпретации результатов, разграничения острой, недавно перенесённой, давно перенесённой инфекции, прогнозирования исхода заболевания *(выздоровление или хронизация процесса)* и последующего выбора тактики лечения важно включать в исследование определение IgA, IgG и IgM.

После перенесённой инфекции IgG могут циркулировать в крови несколько месяцев или лет.

Иммуноглобулины классов А и М при благоприятном исходе иерсиниозов исчезают из сыворотки крови в течении 2–6 месяцев. Сохранение в крови IgA и/или IgM более 6-ти месяцев свидетельствует о хроническом течении заболевания и персистенции возбудителя.

Увеличение или уменьшение КП в динамике свидетельствует о нарастании или снижении, соответственно, титра АТ.

Достоверным считать изменение КП в 2 раза и более.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменения концентрации иммуноглобулинов класса G к иерсиниям в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования *(одного предприятия-изготовителя)*.

Рекомендуется исследовать парные сыворотки с интервалом 3–4 недели.

При интерпретации результатов можно руководствоваться приведённой ниже таблицей:

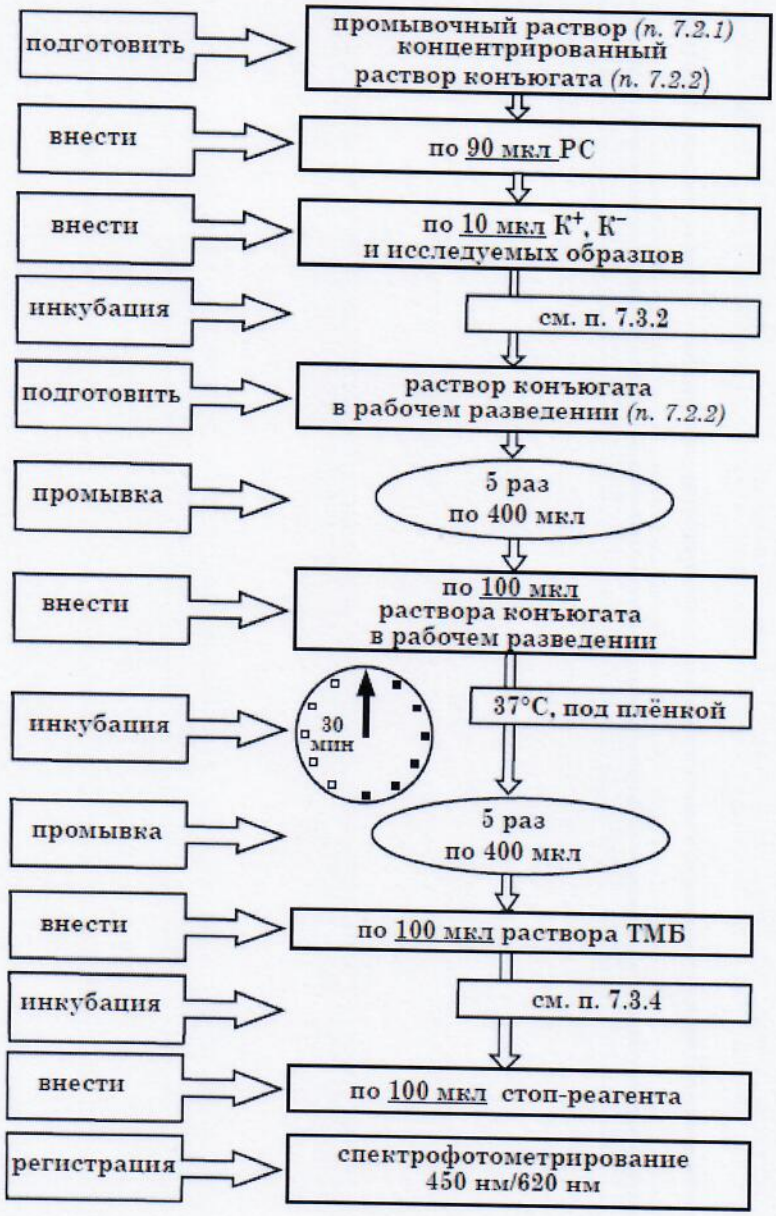
IgG	IgM	IgA	Интерпретация
+	—	—	перенесённая в прошлом инфекция
+	+, но КП снижается в течении 3–-6 мес.	+, но КП снижается в течении 3–6 мес.	недавно перенесённая инфекция с исходом в выздоровление
+ или —	— или +, но КП снижается в динамике	+ более 6 мес.	персистенция возбудителя. Артриты, узловатая эритема, миокардиты и др. осложнения инфекционно-аллергического характера
+ или —	+ более 6 мес.	+ или —	хронические илеиты, тифлиты, колиты и др.

При обследовании больного с подозрением на иерсиниозную инфекцию представляется важным тесное сотрудничество между лечащим врачом и врачом-лаборантом, особенно если получены слабоположительные результаты при тестировании.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Окончательный диагноз формулируется на основании клинико-анамнестических данных, эпидан-намнеза и результатов комплекса лабора торных исследований.

Схема анализа D-3206



ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ/n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru